DOI:10.11931/guihaia.gxzw202212006

中国沙棘 *HrANR* 基因及类黄酮累积与抗旱的关系

刘瑞，赵浪，冶贵生，马玉花*
（青海大学农牧学院 西宁 810016）

摘　要：花青素还原酶（anthocyanidin reductase, ANR）是合成黄酮类物质的关键酶之一，为明确其编码基因结构及干旱胁迫下的表达模式和黄酮类物质含量及二者之间的相关性，该文从中国沙棘转录组数据中筛选获得一个 *ANR* 基因，命名为 *HrANR* 基因。采用生物信息学软件对基因序列及编码蛋白进行分析，并对不同胁迫下各组织中 *HrANR* 基因的表达量和叶中黄酮类化合物含量进行相关性分析。结果表明：（1）中国沙棘 *HrANR* 基因 ORF 为 1 017 bp，编码 338 个氨基酸，为稳定的亲水性蛋白，其 ANR 同源蛋白具有明显的科属特性。（2）干旱胁迫下 *HrANR* 基因在中国沙棘根、茎、叶中均有表达，但表达趋势不同，其中在根中的表达呈先升高后降低再升高、茎中呈持续下降、叶中呈先升高后持续降低的趋势。（3）通过芦丁标准曲线获得不同胁迫程度下中国沙棘叶内黄酮类的含量，表明黄酮类含量先持续上升，随后略有下降，复水后上升至最高点的变化趋势，表明干旱胁迫初期叶黄酮含量与干旱胁迫呈正相关，在严重胁迫下黄酮含量与胁迫呈负相关。（4）*HrANR* 基因的叶和茎的表达量与黄酮类含量呈负相关（$P_{叶}=-0.751\ 43$，$P_{茎}=-0.934$），根中呈正相关（$P_{根}=0.444$）。上述结果表明中国沙棘 *HrANR* 基因的表达及黄酮类含量变化与其抗旱性密切相关，其结果可以为中国沙棘抗旱机制的阐明提供依据。

关键词：中国沙棘，花青素还原酶，干旱胁迫，表达模式，黄酮类
中国分类号：Q943　　　　**文献识别码：**A

Correlation of *HrANR* genes and flavonoid accumulation with drought resistance in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoid*es subsp. *sinensis*)

LIU Rui, ZHAO Lang, YE Guisheng, MA Yuhua*
(*College of Agriculture and Husbandry*, *Qinghai University*, Xining 810016, China)

Abstract: Anthocyanidin reductase is one of the key enzyme involved in the synthesis of flavonoids. In order to explore the structure of *ANR* gene, ANR enzyme expression pattern and flavonoid content under drought stress and its correlation, a *HrANR* gene identified from RNA-seq data of sea buckthorn was screened and analyzed by bioinformatics soft, the expression pattern of *HrANR* gene in different tissues and the content of flavonoid in leaves was performed. The results were as follows: (1) The ORF of *HrANR* gene is 1 017 bp, which encodes 338 amino acids. It is a stable hydrophilic protein, and the homologous protein has significant family and genus characteristics. (2) *HrANR* gene was expressed in roots, stems and leaves of sea buckthorn under drought stress, but the expression trends were different, with an increase followed by a decrease and then an increase in roots, a continuous decrease in stems, and an increase followed by a continuous decrease in leaves. (3) The content of flavonoids in the leaves of sea buckthorn under different levels of stress showed a trend that first increased continuously, then decreased slightly and rose to the highest point after rehydration. The above results indicate that the expression of *HrANR* gene and the changes in flavonoid content are closely related to the drought resistance of sea buckthorn. The flavonoid content in leaves was positively correlated with drought stress at the beginning of drought stress and negatively correlated with drought stress under severe stress. (4) Leaf expression, stem expression and flavonoid content of *HrANR* gene were negatively correlated (P_{leaf}= -0.751 43, P_{stem}= -0.934) and root expression was positively correlated with flavonoid content (P_{root}= 0.444). The above results indicate that

收稿日期：2023-08-11
基金项目：国家自然科学基金（31660071）；青海省科技厅项目（2017-ZJ-734）；青海省"高端创新人才千人计划"项目（2022 年度）。
第一作者：刘瑞(1995-)，硕士研究生，主要从事植物遗传育种研究，（E-mail）18714520216@163.com。
***通信作者：**马玉花（1978-），博士，教授，主要从事森林培育理论与技术、植物资源开发利用的研究，（E-mail）qhxnmyh@163.com。

the expression of *HrANR* genes and changes of flavonoid content in sea buckthorn are closely related to drought resistance, and it can provide a basis for elucidating the drought resistance mechanism of sea buckthorn.

Keywords: *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis*, anthocyanidin reductase, drought stress, expression pattern, flavonoid

植物的生长发育过程中经常会遭受干旱、低温、盐碱及病虫害等影响，其中干旱的危害居众多生物和非生物胁迫之首，持续影响全球生态环境（张宁，2021；Wang, 2017）。在受到干旱胁迫时，植物叶片最先反应，通过关闭气孔以减少蒸腾量、累积渗透调节物以维持细胞膨压从而避免细胞器受损，此外，叶片还可通过累积酚类、萜类和生物碱等次生代谢产物来适应周围环境（Xie et al.,2020）。中国沙棘（*Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis*）是中国特有的沙棘属沙棘（*Hippophae rhamnoides*）种内亚种，也是中国栽培和种植历史最悠久的一个亚种（Wang et al., 2014），具有很强的抗旱性且能够保土固沙，在我国气候干旱的黄土高原和青藏高原广泛分布。

在沙棘中发现的黄酮类化合物超五十种（周浩楠等，2020），其具有抗氧化、降血糖、降血压及增强免疫等功能（陈秋荣，2012；张东和郧国栋，2019；祁建宏和董芳旭，2020）。黄酮类化合物主要存在于植物的果实、根、茎、叶等部位，国内学者通过对沙棘果渣、叶片、果实等不同部位的黄酮类化合物进行分离、鉴定（康健等，2017；洪道鑫等，2017；魏增云等，2020），发现其叶片与果实中活性物质一致，且叶中含量最多（王军宪等，1997）。类黄酮合成包括花青素、黄酮醇、原花青素等途径，其中 *ANR* 基因编码的花青素还原酶（anthocyanidin reductase, ANR）是以苯丙氨酸为底物合成原花色素的关键酶之一，作用于花青素形成表儿茶素，在木本植物如茶树（Senguttuvan et al., 2014）、笃斯越橘（宋冰雪等，2017）、芒果（李先良等，2017）、葡萄（Zhu et al., 2014）中均克隆出了 *ANR* 基因，在香椿（隋娟娟等，2021）、紫花苜蓿（Xie et al., 2004）、川桑（李军，2016）的中发现并证明其表达量与植物适应性密切相关。高国日等（2018）通过转录组测序分析发现中国沙棘主要通过以 ABA 依赖信号途径为主的信号传递途径和以黄酮类合成途径为主的活性氧自由基清除途径响应干旱胁迫。通过上述研究结果可见中国沙棘中黄酮类物质对于其应对干旱胁迫起着重要的作用，但目前在沙棘中黄酮类化合物研究仅停留在提取纯化和活性分析方面，有关中国沙棘黄酮类物质合成相关基因与干旱胁迫的相关性及其与黄酮类含量变化间的关系的研究未见报道。

本研究以中国沙棘转录组数据中筛选出的差异表达 *HrANR* 基因为研究对象，设计特异性引物，PCR 扩增获取 *HrANR* 基因全序列送测序；依托生物信息学软件分析 *HrANR* 基因的序列信息及进化关系；在此基础上采用回流法提取中国沙棘叶总黄酮，紫外分光光度计法测量总黄酮含量，通过统计分析软件，拟讨论以下几个问题：（1）中国沙棘 *HrANR* 基因序列信息及其同源性；（2）干旱胁迫下 *HrANR* 基因的时间表达特性；（3）*HrANR* 基因的时空表达与总黄酮含量是否存在直接关系，旨在为黄酮类与中国沙棘抗旱性之间的关系阐明提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采集青海省西宁市湟源县（36°46′24″ N，101°14′11″ E，海拔 3 010 m）的中国沙棘种子在青海省玛可河育苗基地播种育苗，苗木培养采用张丹等（2021）的方法，待幼苗生长至 20 cm 左右时，选择健康且无病虫害的幼苗一部分采集叶片进行 *HrANR* 基因的扩增，另外一部分进行干旱胁迫处理。

1.2 干旱胁迫处理

选择长势一致且无病虫害的幼苗，分为对照组（CK）和处理组（drought stress, DS），CK 组照常浇灌，DS 组停止浇水直至苗木缺水萎蔫。在干旱胁迫处理前将苗木灌水浇透，24 h 后开始试验，在胁迫第 9 天复水（预实验中，DS 组在第 10 天进行复水处理的幼苗不能恢复直至枯死），于每日 9 点采样，每个处理组设 3 个平行对照。分别在胁迫处理的 0 d（CK）、3 d（DS1）、6 d 天（DS2）、9 d（DS3）、复水 48 h（RW）采集样本用于后续实验，其中一部分中国沙棘的根茎叶组织分别液氮速冻后存于-80 ℃，用于基因表达模式研究，另外一部分中国沙棘采集叶片干燥后用于黄酮类含量分析，每个组织每个处理各 3 次生物学重复。

1.3 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

RN38 植物 RNA 试剂盒（大连艾德莱生物科技有限公司，50 次）提取中国沙棘各组织总 RNA。对微量核酸蛋白测定仪（美国，赛默飞世尔，NanoDrop）和 2%琼脂糖凝胶电泳检测合格的 RNA 用 PrimeScript®II1st Strand cDNA Synthesis Kit（TaKaRa，6210A，50 次）反转录获得 cDNA。

1.4 *HrANR* 基因的扩增

根据前期中国沙棘全长转录组测序（Plos one, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202213）获得的 *HrANR* 基因序列设计引物 *HrANR-F*：5′-ATAAATCGTCAACGAACC-3′和 *HrANR-R*：5′-TTCATACCCTAACTTCTA-3′，扩增产物长度为 1 017 bp，使用 *rTaq* 酶（TaKaRa，DR100A，250U）以中国沙棘叶的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，产物进行凝胶电泳检测，对获得的条带单一大小符合预期的扩增产物送往生工生物工程（上海）有限公司进行双向测序。

1.5 生物信息学分析

核苷酸和氨基酸序列特征用 Editseq 分析。*HrANR* 基因编码蛋白的相对分子质量、等电点、稳定性等采用 Prot Param (https://web. expasy.org/protparam/)进行分析；利用 Kyte-Doolittle 分析 HrANR 蛋白的疏水性。Predict protein（http://www.predictprotein.org/）和 Swiss model（https://swissmodel.expasy.org/）进行 HrANR 蛋白二级、三级结构的分析；利用 SignalP 5.0（SignalP-5.0-Services-DTU Health Tech）进行 HrANR 蛋白信号肽预测；跨膜区预测采用 TMHMM（https://services. healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0）进行；蛋白质亚细胞定位预测采用在线分析网站 Predict protein（https://www.predictprotein.org/）进行；利用 DNAMAN 进行同源蛋白序列分析；利用 NCBI 中的 Blastp 进行同源序列的搜索，使用 MEGA6.0 构建 NJ 进化树；利用 Megalin 计算同源性。

1.6 实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）分析

通过在线软件设计荧光定量引物 *HrANR-DL-F*：5′-AATTCACTTACAGGCACAGGGTTGG 和 *HrANR-DL-R*：5′-AGCTAGTGTCTTGGAGGCAGGATAG-3′。选择在不同胁迫下能稳定表达的基因作为内参基因，根内参基因选择 *TATA*（*F*: 5′-AAGTTGGCAGCACGAAAGTATG-3′，*R*: 5′-GGGGAATTTAACATCACAAGAACC-3′）、叶内参基因选择 *HIS*3（*F*: 5′-CCGTAAATCAGCCCCAACC-3′，*R*: 5′-GAACAAGCCTCTGGAATGGAA-3′）、茎内参基因选择 *PEPC*（*F*: 5′-GTCGTCCATCAAAACGCAAG-3′，*R*: 5′-AAGCCAAGCCACACAGGTAAA-3′）。在 Q2000 B 荧光定量 PCR 仪（杭州朗基）上进行 qRT-PCR，3 次生物学重复。

1.7 中国沙棘叶片黄酮类提取及含量测定

将干旱胁迫处理的中国沙棘叶片使用冷冻干燥机（上海 BILON-FD80A）干燥后，使用组织捣碎机（常州，JTLIANGYHOU-JJ-2）粉碎，过 80 目筛，石油醚脱脂后使用王树林（2008）的方法提取黄酮类两次，合并提取液，第一次使用 50%乙醇（物料比 1∶10）在 70 °C 下回流 2.0 h，第二次使用 50%乙醇（物料比 1∶8）在 70 °C 下回流 1.5 h。黄酮类化合物的含量用紫外分光光度计（型号 DR6000，美国哈希）进行测定，本应测量 280 nm 处原花色素含量，但该方法只适应纯度较高的原花色素溶液，但儿茶素在此也有最大吸收，因而测量 510 nm 处总黄酮含量，以芦丁标准品（中国药品生物制品鉴定所）使用冯智鹏等（2017）的方法制作标准曲线。

1.8 数据统计分析

荧光定量使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各个样本的 *HrANR* 基因的相对表达量，类黄酮提取使用 Excel 建立标准曲线，Microsoft Excel 2010 和 SPSS 22 进行数据的统计分析，图表由 Sigmaplot 14.0 制作。

2 结果与分析

2.1 *HrANR* 基因的克隆及序列分析

以中国沙棘叶的总 RNA 经反转录合成的 cDNA 为模板，以 *HrANR-F*、*HrANR-R* 为引物进行 PCR 扩增，得到了单一条带的扩增结果（图 1）。对扩增得到的基因测序后得到 *HrANR* 基因的序列，采用 DNAMAN 分析表明其 ORF 长度为 1 017 bp。

2.2 编码氨基酸序列分析及编码蛋白生物信息学分析

HrANR 基因编码 338 个氨基酸，其中 Leu 数量最多（10.1%），Trp 数量最少（0.9%）；其中带负电荷氨基酸残基（Asp + Glu）共 38 个，带正电荷氨基酸残基（Arg + Lys）35 个；编码蛋白分子量为 36

660.19，理论等电点（pI）为 6.03，为亲水性蛋白（图 2），其中 194 位的异亮氨酸疏水性最强（2.178），而 43 位的谷氨酸亲水性最强（-2.633）。使用 Predict protein 预测中国沙棘 HrANR 蛋白表明该蛋白亚细胞定位在细胞质中，二级结构预测发现，该基因编码蛋白中α-螺旋占 40.83%，无规则卷曲占 37.57%，延伸链占 14.20%，β-折叠为 7.40%（图 3），因此说明α-螺旋和无规则卷曲是 HrANR 蛋白二级结构主要构象单元。由图 4 Swiss model 预测的中国沙棘 HrANR 蛋白的三维结构模型可知，预测结果与二级结构预测一致。根据 SignalP 5.0 对 HrANR 蛋白信号肽的预测结果，表明该蛋白信号肽存在的可能性为 0.15%，说明中国沙棘 HrANR 蛋白不存在信号肽，属于非分泌蛋白。利用 TMHMM 进行中国沙棘 HrANR 蛋白跨膜区的预测，结果表明其无跨膜结构，这与亚细胞定位的结果中该蛋白定位于细胞质的结果一致。

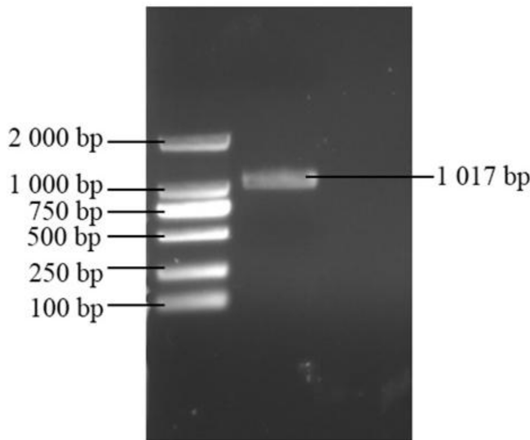


图 1 *HrANR* 基因扩增电泳图

Fig.1 PCR amplification of *HrANR* gene

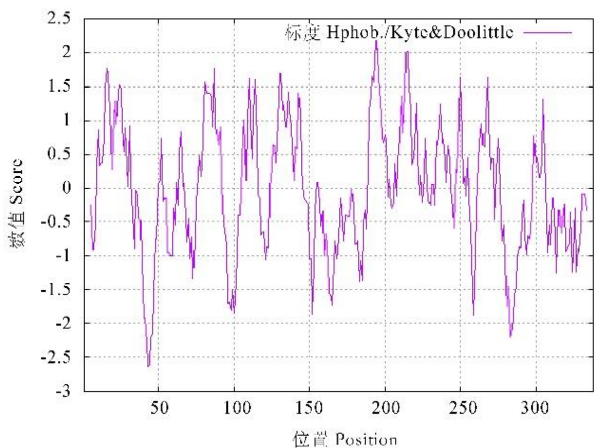
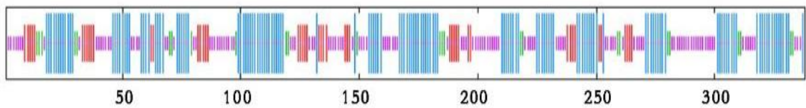


图 2 HrANR 蛋白的亲/疏水性预测

Fig.2 Prediction of Hydrophobicity or hydrophilia of HrANR Protein



蓝色代表α-螺旋，红色代表延伸链，紫色代表无规则卷曲，绿色代表β-折叠。

Blue represents α-helix, red represents exended strand, purple represents random coli, and green represents β-angle.

图 3 蛋白二级结构预测

Fig.3 Secondary structure of the ANR protein

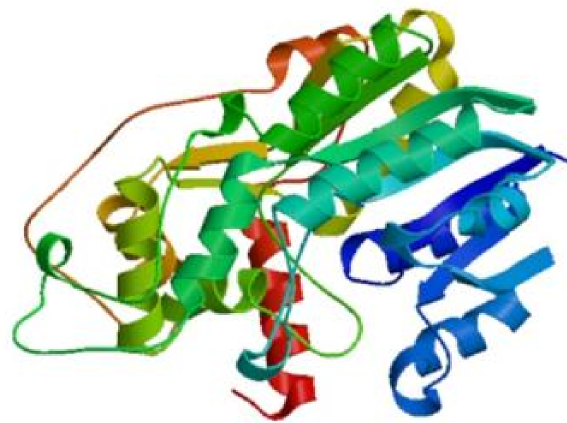
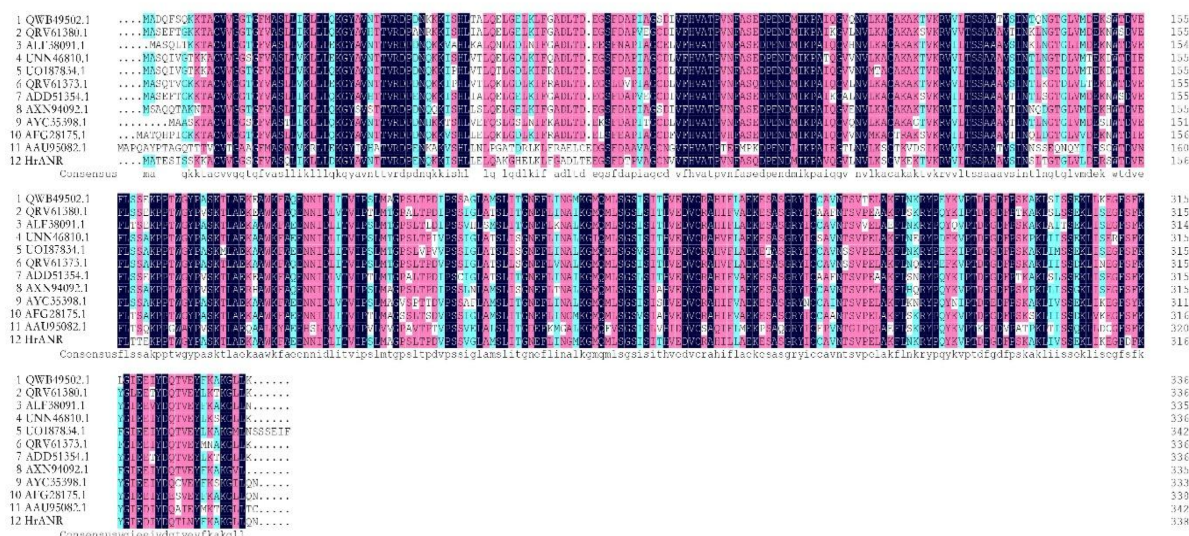


图 4 中国沙棘 ANR 蛋白空间构象

Fig.4 Tertiary structure of HrANR

2.3 *HRANR* 同源蛋白的同源性及系统进化树

通过 NCBI 查找到 11 个与 HrANR 蛋白同源[12，中国沙棘(*Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis*)]的序列，即香椿（*Toona sinensis*，1，QWB49502.1）、荔枝（*Litchi chinensis*，2，QRV61380.1）、巴西海岛棉（*Gossypium barbadense*，3，ALF38091.1）、乌苏里杨（*Populus ussuriensis*，4，UNN46810.1）、药蜀葵（*Althaea officinalis*，5，UOI87834.1）、龙眼（*Dimocarpus longan*，6，QRV61373.1）、可可（*Theobroma cacao*，7，ADD51354.1）、杧果（*Mangifera indica*，8，AXN94092.1）、越橘（*Vaccinium corymbosum*，9，AYC35398.1）、葡萄（*Vitis bellula*，10，AFG28175.1）、银杏（*Ginkgo biloba*，11，AAU95082.1）。对上述植物的 ANR 氨基酸序列进行多重比对（图 5）、分析序列同源性（图 6），并绘制 NJ 系统进化树（图 7）。DNAMAN 软件对多重序列快速比对（quick alignment）表明其序列一致性（identity）达 83.36%，Megalin 软件多重序列间单链一致性（percent identity）在 57.7%~97.0%之间，其中香椿与中国沙棘 *HrANR* 编码蛋白一致性最高达 84.2%，与银杏差异性最大达 54.1%，从系统进化树关系上看，12 个物种聚为两大类四个分支，其中中国沙棘与被子植物聚为一类，裸子植物银杏单独一簇，与图 6 差异性关系相符，且符合进化规律，另外无患子科荔枝与龙眼聚为一组，锦葵科药蜀葵和巴西海岛棉聚为一组，表明 ANR 蛋白具有明显的科属特性。



左侧为物种名，右侧数字代表碱基位数。

The left side of the figure for the species name, the number on the right side of the base number.

图 5 HrANR 氨基酸序列多重比对

Fig.5 Multiple sequence alignment of amino acid homology of HrANR

一致性 Percent identity

差异性 Divergence

	11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	
11		60.4	59.8	60.0	59.8	56.7	58.9	59.5	59.4	57.7	59.2	61.2	11
1	55.7		84.8	85.4	84.5	83.3	84.5	84.2	86.9	82.5	83.0	84.2	1
2	56.9	17.0		81.5	81.5	80.4	80.7	97.0	81.8	79.5	79.8	78.3	2
3	56.6	17.3	21.3		84.2	83.0	83.6	81.2	83.2	81.6	83.0	80.9	3
4	56.9	17.4	21.2	17.8		92.0	90.2	81.5	82.7	81.9	81.8	81.0	4
5	63.6	18.9	22.8	19.4	8.5		90.2	80.1	81.2	80.2	81.6	78.6	5
6	58.8	17.4	22.4	18.6	10.6	10.6		81.0	83.0	79.5	81.5	80.4	6
7	57.5	17.8	3.0	21.7	21.2	23.2	22.0		82.4	79.5	80.1	70.3	7
8	57.8	14.5	20.9	19.0	19.7	21.7	19.4	20.1		81.0	82.1	79.1	8
9	61.5	19.9	24.0	21.1	20.7	23.1	24.0	24.0	22.0		81.7	79.9	9
10	58.3	19.3	23.6	19.4	20.8	21.2	21.2	23.2	20.5	21.1		81.0	10
12	54.1	17.8	25.7	22.1	22.0	25.2	22.8	25.7	24.6	23.5	22.0		12
	11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	

图 6 多重序列一致性及差异性比对

Fig.6 Percent identity and divergence of multiple sequence

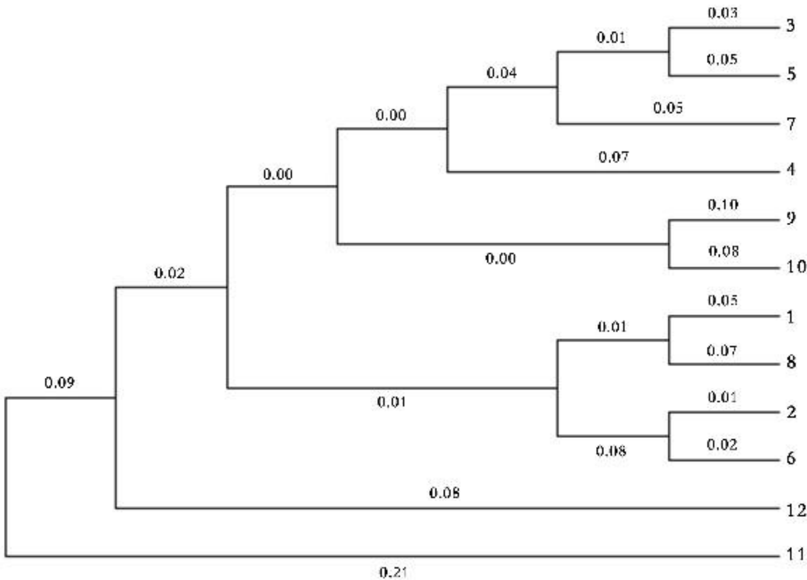
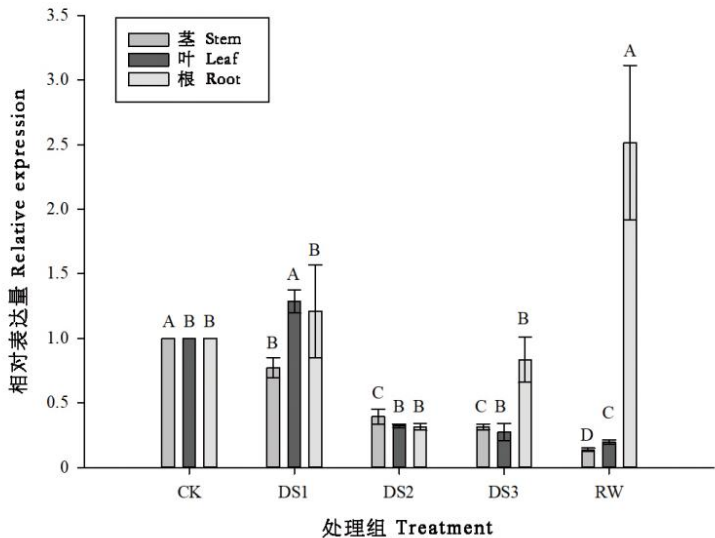


图 7 *HrANR* 编码蛋白系统进化树

Fig.7 Phylogenetic tree of *HrANR*-encoded proteins

2.4 *HrANR* 基因的表达量分析

对不同程度干旱胁迫的中国沙棘的根、茎、叶分别进行 qRT-PCR 以检测 *HrANR* 基因的表达情况。由图 8 可知，中国沙棘根中 *HrANR* 基因表达量呈现先上升后下降，在 DS2 时达到最小值，而后增加的趋势，复水后表达量继续上升并达到最大值；随着干旱的加剧，茎中 *HrANR* 基因表达量呈持续下降的趋势，复水后也未能恢复并继续下降；叶中 *HrANR* 基因表达量呈现胁迫初期上升而后在重度胁迫以及复水后均持续下降的趋势。方差分析表明中国沙棘不同干旱胁迫处理的根、茎、叶中 *HrANR* 基因的表达差异极显著（$P<0.01$）。



不同字母表示极显著差异(P＜0.01)。下同。

Different letters indicate extremely significant differences($P < 0.01$). The same below.

图 8 中国沙棘 *HrANR* 基因的表达模式

Fig.8 Expression mode of *HrANR* gene of sea buckthorn under drought stresses

2.5 不同胁迫下中国沙棘叶中的黄酮类含量

将不同胁迫程度的两次叶片提取液合并后，吸取 5 mL 提取液稀释 5 倍后与芦丁标准液（标准曲线 y=0.4 108x–0.003 3（R^2=0.998 6））通过紫外分光光度计在 510 nm 处比对，测定黄酮类化合物含量，结果见图 9。由图 9 可知，在胁迫前期叶片中黄酮类含量逐渐上升，在 DS2 达到峰值（3.38 mg·mL^{-1}），在 DS3 中略有下降，而复水后又上升至最大值（3.975 mg·mL^{-1}），不同胁迫程度下中国沙棘叶中黄酮类含量的变化差异极显著（P＜0.01）。比对图 8 和 9 中 *HrANR* 基因在叶中的表达模式和黄酮类含量累积的趋势并不一致，通过 SPSS 分析，*HrANR* 基因的叶表达量、茎表达量和黄酮类含量呈负相关关系（皮尔森相关系数：$P_{叶}$=-0.751 43，$P_{茎}$=-0.934），根表达量与黄酮类含量呈正相关关系（$P_{根}$=0.444）。

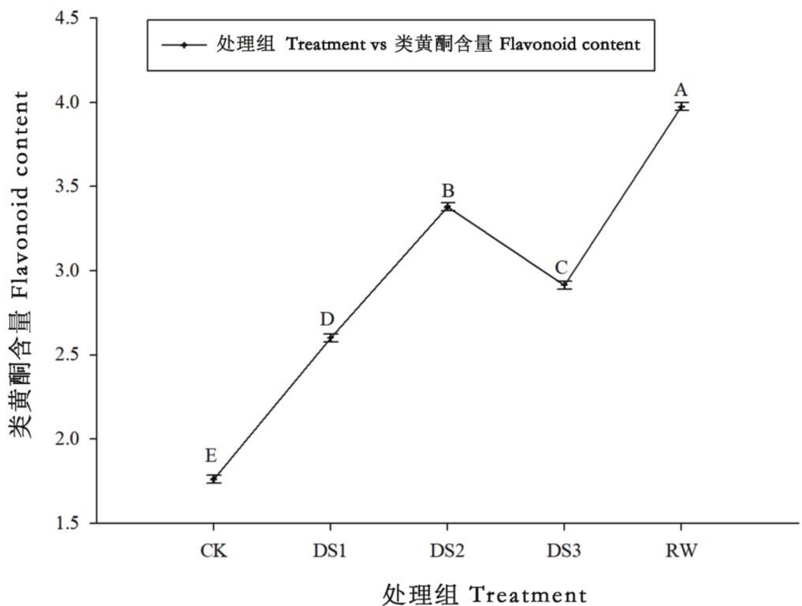


图 9 干旱胁迫下中国沙棘叶片黄酮类含量

Fig.9 Flavonoid contents of sea buckthorn leaves under drought stresses

3 讨论与结论

干旱胁迫影响植物的生长发育，为了适应胁迫，植株会迅速做出一系列生理生化响应以避免细胞器受损。研究表明胁迫下植株的机体防御、信号传递、生长发育均与次生代谢产物相关（Shao et al., 2009），其中 *ANR* 基因通过编码原花色素生物合成途径的酶而直接影响生物体总黄酮含量的变化，从而响应胁迫。中国沙棘作为药用沙棘的主要来源，其叶中含有大量的黄酮类物质，不仅具有极高的药用价值，同时高黄酮含量对中国沙棘应对干旱等逆境胁迫具有重要的作用（Li et al., 2022）。通过研究干旱胁迫下 ANR 基因的表达情况及其与黄酮类物质累积的关系，不仅有助于阐明中国沙棘抗旱分子机制，同时研究结果可应用于生产实际，通过环境调控直接影响中国沙棘叶中 *ANR* 基因的表达，以达到控制沙棘叶片黄酮产量，对于开辟沙棘高黄酮类含量植株定向培育可提供新的途径。

蛋白质的结构决定其功能，本文的研究发现中国沙棘 HrANR 蛋白与杉木（王培等，2019）一样是不具有信号肽和跨膜结构、定位于细胞质中的亲水性蛋白，二级结构与红花（鲁丹丹等，2022）、笃斯越橘（宋冰雪等，2017）相似，均以 α 螺旋和无规则卷曲为主；同源多重序列比较发现与香椿同源性最高，说明亲缘性最近，推测其蛋白结构和功能更相近，且 NJ 进化树中 12 个物种存在明显种属特性，在分支内平行进化，符合形态学分类结果（中国植物志编辑委员会，中国植物志）。

马敬等（2012）发现在花生不同组织中 *ANR* 基因表达量会有所差异。鲁丹丹等（2022）对红花中 *ANR* 基因的研究表明其表达量在根和茎中较低。朱灿灿（2010）在银杏中发现随着干旱时间的延长其体内 *ANR* 基因的表达量波动变化，但总体是增加的趋势。鲁晓翔（2012）认为一定范围内，植物的抗氧化性与 *ANR* 基因表达量成正比。本研究中 *HrANR* 基因在干旱胁迫的中国沙棘根茎叶中的表达趋势呈现不同趋势，其中在叶中呈现出先上升后下降的趋势，茎中则随着干旱胁迫的加剧持续下降，而在根中则为先升后降而后持续上升的波动趋势，表明在胁迫过程中 *HrANR* 基因的表达对于干旱胁迫是一个动态适应过程，*ANR* 基因与中国沙棘应对干旱胁迫关系密切。

黄酮类物质包括黄烷酮、儿茶素和花青素（Leonard et al.，2006），黄酮类化合物本身具有抗氧化性，干旱可以诱导植物体内黄酮类化合物的累积从而提高植物的耐旱性以使其适应环境（Foyer et al.，2010）表明黄酮类物质对植物的应激和抗逆性具有重要作用。已有研究发现马铃薯（Watkinson，2006）和淫羊藿（石进校等，2004）的抗旱性均与黄酮类含量明显相关，其中研究表明花青素抗氧化性远高于 *Vc*、*Ve* 和*β*胡萝卜素（鲁晓翔，2012）。Li 等（2022）研究发现 *ANR* 基因的过表达可以促进花青素的累积，从而提高植物的抗旱能力。在本研究中，干旱胁迫初期叶黄酮类含量与干旱胁迫呈正相关，而 *HrANR* 基因的表达与之对应，呈上升趋势，在严重胁迫下二者与干旱胁迫均呈负相关，说明在一定程度的干旱胁迫下，中国沙棘可通过 *HrANR* 基因等黄酮类合成相关基因的表达以累积黄酮类来加强氧自由基的清除能力从而对胁迫进行响应，与孟庆华等（2012）的结果一致。而当干旱持续一定的时间后，胁迫程度可能已超过中国沙棘自身干旱胁迫承受能力，严重的胁迫使毒害物质含量增加，使中国沙棘生长受到严重影响，各种保护物质的合成亦受到了抑制。同时在变化趋势上，叶片中 *HrANR* 基因在第 6 天开始呈下降趋势，而黄酮类含量下降则有延迟（在胁迫 9 天时开始呈下降的趋势）。复水后中国沙棘叶中黄酮类含量与 *HrANR* 基因的表达情况相反，其中黄酮类含量在复水后急剧上升，而 *HrANR* 基因的表达在叶中的表达则依旧呈现下降的趋势，与之相反，中国沙棘根中 *HrANR* 基因的表达在复水后则呈急剧上升的趋势，推测由于复水时间较短，中国沙棘根系吸收的水分先满足根系自身的需要，地上部分依旧处于缺水状态，而根系中通过 *HrANR* 基因等的大量表达而使大量合成的黄酮类物质被运输至叶片发挥作用，从而使叶片中黄酮类含量上升。上述结果表明中国沙棘 *HrANR* 基因及黄酮类含量变化与其抗旱性密切相关。

基因表达量是基于转录水平的，而 RNA 很不稳定，尤其是在重度胁迫下（本研究中干旱胁迫第 6 天和第 9 天）其半衰期更短、容易降解，而基因的表达产物较稳定（杨荣武，2017），因而在基因表达量下降时表达产物依然能够因为持续的累积而保持上升的趋势，从而持续发挥抗旱功能，这可能是本研究中中国沙棘中黄酮类含量与 *ANR* 基因表达不一致的原因之一。另外植物通过筛管自上而下运输有机物，在本研究中，干旱胁迫第 9 天根中 *HrANR* 基因的表达量急剧上升，且在复水后持续呈现上升的趋势，致使根系不断累积黄酮类物质，而根系中合成的黄酮类物质通过筛管运输至叶片，这可能是导致叶片中黄酮类含量与 *HrANR* 基因的表达在复水后不一致的另一主要原因。

目前国内外对于沙棘干旱胁迫相关基因的研究较多，但多针对于 ABA 信号转导途径、CA^{2+}信号途径、MAPK 蛋白激酶途径等，对于次生代谢产物与抗旱性之间相关性的研究仅有孙坤等（2015）对肋果沙棘的研究。为进一步明确 *HrANR* 基因与中国沙棘抗旱性的关系，有必要对干旱胁迫下其他黄酮类合成相关基因的表达量与黄酮类含量的关系进行综合评估，同时通过转基因手段获得过表达植株研究 *HrANR* 基因的抗旱功能，为中国沙棘抗旱机理的阐明提供依据。

参考文献：

CHEN QR, 2012. Analysis of pharmacological action of flavonoid compounds [J]. Chin Pract Med, 7(21): 254-255. [陈秋荣，2012. 黄酮类化合物药理作用的分析 [J]. 中国实用医药，7（21）：254-255.]

Editorial Committee of Flora of China,1983. Flora Reipublicae Popularis Sinicae [M]. Beijing: Science Press, 52(2): 64.[中国植物志编辑委员会，1983. 中国植物志[M]. 北京：科学出版社，52（2）：64.]

FENG ZP, YE GS, YUAN H, et al., 2017. Extraction technology for flavonoids from fruit marc of wild *Hippophae thibetanain Qinghai* [J]. N Hort, 376(1):142-147.[冯智鹏，冶贵生，袁海，等，2017.青海野生西藏沙棘果渣黄酮的提取工艺[J]. 北方园艺，376（1）：142-147.]

FOYER CH, LELANDAIS M, KUNERT KJ, 2010. Photooxidative stress in plants[J]. Physiol Plantarum, 92(4):696-717.

GAO GR, 2018. The physiological and molecular mechanism of sea buckthorn(*Hippophae rhamnoides*) in response to drought stress and rehydration [D]. Beijing: Chinese Academy Forestry. [高国日，2018. 沙棘对干旱胁迫和复水响应的生理及分子机制[D]. 北京：中国林业科学研究院.]

HONG DX, ZHANG YX, LI XH, et al., 2017. Chemical constituents of flavonoids in leaves of *Hippophae thibetana* [J]. J Chin Med Mat, 40(4): 861-864. [洪道鑫，张雨欣，李轩豪，等，2017. 西藏沙棘叶黄酮类化学成分的研究[J]. 中药材，40（4）：861-864.]

IBRAHIM W, ZHU YM, CHEN Y, et al., 2019. Genotypic differences in leaf secondary metabolism, plant hormones and yield under alone and combined stress of drought and salinity in cotton genotypes[J]. Physiol Plantarum,165(2): 343-355.

KANG J, WANG L, SUN WS, et al., 2017. Ultrasound extraction and analysis of flavonoids from Xinjiang seabuckthorn marc[J]. J Food Saf Qual, 8(8): 2927-2931. [康健，王玲，孙文胜，等，2017. 新疆沙棘果渣中黄酮的超声提取及成分分析[J]. 食品安全质量检测学报，8(8)：2927-2931.]

LEONARD E, CHEMLER J, LIM KH, et al., 2006. Expression of a soluble flavone synthase allows the biosynthesis of phytoestrogen derivatives in *Escherichia coli*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 70: 85-91.

LI D, YANG J, PAK S, et al., 2022. *PuC3H35* confers drought tolerance by enhancing lignin and proanthocyanidin biosynthesis in the roots of *Populus ussuriensis* [J]. New Phytol, 233(1): 390-408.

LI J, LIANG HN, ZHAO AC, et al., 2016. Cloning and expression analysis of anthocyanidin reductase gene from *Mulberry* [J]. Acta Sericol Sin, 42(4): 570-575. [李军，梁燕梅，赵爱春，等，2016. 桑树花青素还原酶基因 *MaANR* 的克隆和表达分析 [J]. 蚕业科学，42（4）：570-575.]

LI XL, ZHAO ZC, GAO AP, et al., 2017. Cloning and expression analysis of *ANR* gene in *Mangifera indica* L. [J]. Jiangsu Agric Sci, 45(4): 22-5. [李先良，赵志常，高爱平，等，2017. 芒果 *ANR* 基因的克隆及其表达分析 [J]. 江苏农业科学，45(4)：22-25.]

LU DD, TAN ZW, LI L, et al., 2022. Cloning and expression analysis of Anthocyanidin reductase gene *ANR* in *Carthamus tinctorius* L. [J]. J Nucl Agric, 36(3): 517-26. [鲁丹丹，谭政委，李磊，等，2022. 红花花青素还原酶基因 *ANR* 的克隆及表达分析 [J]. 核农学报，36（3）：517-526.]

LU XX, 2012. Research progress in antioxidant mechanism of flavnonids[J]. Food Res Dev, 33(3): 220-224. [鲁晓翔，2012. 黄酮类化合物抗氧化作用机制研究进展 [J]. 食品研究与开发，33（3）：220-224.]

MA J, SU L, YUAN M, et al., 2012. Cloning and expression analysis of *C4H* and *ANR* genes in peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. J Nucl Agric, 26(1): 43-48. [马敬，苏磊，袁美，等，2012. 花生 *C4H* 和 *ANR* 基因的克隆与表达研究 [J]. 核农学报，26（1）：43-48.]

MENG QH, YU XX, ZHANG HF, et al., 2012. Flavonoids' mechanism of scavenging free radicals and its application as natural antioxidants[J]. J Yunnan Minzu Univ (Nat Sci Ed), 21(2): 79-83. [孟庆华，于晓霞，张海凤，等，2012. 天然黄酮类化合物清除自由基机理及其应用进展 [J]. 云南民族大学学报（自然科学版），21（2）：79-83.]

QI JH, DONG FX, 2020. Research progress on chemical components and pharmacological action of *Hippophae rhamnoides*[J]. J Beijing Union Univ, 34(3): 89-92. [祁建宏，董芳旭，2020. 黄酮类化合物药理作用研究进展 [J]. 北京联合大学学报，34（3）：89-92.]

SENGUTTUVAN, MURALIDARAN, ABUL, et al., 2014. Molecular cloning, computational and expression analysis of anthocyanidin reductase in tea (*Camellia sinensis*) [J]. Appl Biochem Biotechnol Part A Enzy Engineer Biotechnol, 9 (174): 130-145.

SHAO HB, CHU LY, JALEEL CA, et al., 2009. Understanding water deficit stress-induced changes in the basic metabolism of higher plants-biotechnologically and sustainably improving agriculture and the eco-environment in arid regions of the globe [J]. Crit Rev Biotechnol, 29(2): 131.

SHI JX, YI LB, TIAN YB, 2004. The relationship between the quantity change of total flavone in *Epimedium* and protective enzyme under drought stress[J]. J Jishou Univ（Nat Sci Ed）, 4: 80-83. [石进校，易浪波，田艳英，2004. 干旱胁迫下淫羊藿总黄酮与保护酶活性[J]. 吉首大学学报（自然科学版），4：80-83.]

SONG BX, QU YY, SU Q, et al., 2017. Cloning and sequence analysis is of anthocyanidin reductase gene (*ANR*) from *Vaccinium uliginosum*[J]. Agric Sci J Yanbian Univ, 39(4): 1-6. [宋冰雪，曲盈媛，苏强，等，2017. 笃斯越橘花青苷合成酶基因(*ANR*)的克隆与序列分析 [J]. 延边大学农学学报，39（4）：1-6.]

SUI JJ, YANG JX, HU X, et al., 2021. Cloning and expression analysis of *TsANR* gene under temperature stress in *Toona sinensis*[J]. J Fuyang Norm Univ (Nat Sci Ed), 38(1): 57-61. [隋娟娟，杨京霞，胡新，等，2021. 香椿 *TsANR* 基因的克隆及在温度胁迫下的表达分析 [J]. 阜阳师范大学学报（自然科学版），38（1）：57-61.]

SUN K, ZHANG HT, CHEN W, et al, 2015. Effects of drought stress on flavonoids metabolism involved in test-tube plantlets leaves of *Hippophae neurocarpa*[J]. J NW Norm Univ (Nat Sci Ed) , 51(3): 72-78. [孙坤，张宏涛，陈纹，等，2015. 干旱胁迫对肋果沙棘*(Hippophae neurocarpa)*试管苗叶片黄酮类化合物代谢的影响[J]. 西北师范大学学报（自然科学版），51（3）：72-78.]

WANG H, LIU H, YANG M, et al., 2014. Phylogeographic study of Chinese seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* Rousi) reveals two distinct haplotype groups and multiple microrefugia on the Qinghai-Tibet Plateau [J]. Ecol Evol, 4(22): 4370-4379.

WANG J, LI Y, HUANG J, et al., 2017. Growing water scarcity, food security and government responses in China [J]. Glob Food Secur, 14: 9-17.

WANG P, LI N, ZHANG JJ, et al., 2019. *ANR* gene expression during the formation of sterile seeds of *Cunninghamia lanceolat* [J]. J For Environ, 39(1): 1-8. [王培，理挪，张家君，等，2019. 杉木涩籽形成过程的花青素还原酶基因表达 [J]. 森林与环境学报，39（1）：1-8.]

WANG SL, 2008. Study on the extraction technology of flavones from leaves of *Hippophae rhamnoides* Linn [J]. Food Res Dev, 8: 110-3. [王树林，2008. 沙棘叶黄酮提取工艺研究 [J]. 食品研究与开发，8：110-113.]

WATKINSON JI, HENDRICKS L, SIOSON AA, et al., 2006. Accessions of *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* show differences in photosynthetic recovery after drought stress as reflected in gene expression profiles[J]. Plant Sci, 171(1): 745-758.

WEI ZY, CHEN JE, ZHANG HR, 2010. The active chemical composition and medical applications of sea buckthorn [J]. J Xinzhou Teach Univ, 26(5): 46-48. [魏增云，陈金娥，张海容，2010. 沙棘的活性化学成分与医疗应用[J]. 忻州师范学院学报，26（5）：46-48.]

XIE DY, SHARMA SB, DIXON RA, 2004. Anthocyanidin reductases from *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana* [J]. Arch Biochem Biophys, 422(1): 91-102.

XIE HC, SHI JQ, SHI FY, et al., 2020. Aphid fecundity and aphid defenses in wheat exposed to a combination of

heat and drought stresses[J]. J Exp Bot, 71(9): 2713-2722.

YANG RW, 2017. Molecular biology[M]. Nanjing: Nanjing University Press, 9: 636. [杨荣武，2017. 分子生物学 [M]. 南京：南京大学出版社，9：636.]

ZHANG D, WU GD, 2019. Research progress on chemical components and pharmacological action of seabuckthorn flavonoids[J]. Chin Pharm, 30(9): 1292-1296. [张东，郇国栋，2019. 沙棘黄酮的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国药房，30（9）：1292-1296.]

ZHANG D, MA HR, ZHANG XZ, et al., 2021. Changes in proline content and expression patterns of key regulatory genes in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis*) under drought stress[J]. Mol Plant Breed, 19(22): 7596-7603.[张丹，马红荣，张秀芝，等，2021. 干旱胁迫下中国沙棘脯氨酸含量变化及其关键调控基因的表达模式[J]. 分子植物育种, 19（22）：7596-7603]

ZHANG N, 2021. Climate change or global food crisis[J]. Ecol Econ, 37(8): 5-8. [张宁，2021. 气候变化或致全球粮食危机[J]. 生态经济，37（8）：5-8.]

ZHOU HN, HU N, DONG Q, et al., 2020. Research progress on the chemical composition and pharmacological action of *Hippophae rhamnoides* [J]. W Chin J Pharm Sci, 35(2): 211-217. [周浩楠，胡娜，董琦，等，2020. 沙棘化学成分及药理作用的研究进展 [J]. 华西药学杂志，35（2）：211-217.]

ZHU CC, TIAN YL, CAI FL, et al., 2010. Effects of drought stress on annual dynamic change of flavonoid contents in *Ginkgo biloba* leaves [J]. J For Eng, 24(4): 67-71. [朱灿灿，田亚玲，曹福亮，等，2010. 干旱胁迫对银杏叶类黄酮年动态变化的影响 [J]. 林业科技开发，24（4）：67-71.]

ZHU Y, PENG QZ, LI KG, et al., 2014. Molecular cloning and functional characterization of the anthocyanidin reductase gene from *Vitis bellula* [J]. Planta, 240(2): 381-398.